

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-228437

(43)Date of publication of application : 24.08.1999

(51)Int.Cl.

A61K 35/80
A61K 35/80
A61K 7/00
A61K 7/48

(21)Application number : 10-030936

(71)Applicant : MICRO ARUJE CORPORATION
KK

(22)Date of filing : 13.02.1998

(72)Inventor : FUJITANI NAOTAKA
SAKAKI SETSUKO
YAMADA ASAYO
YAMAGUCHI YUJI
TAKENAKA HIROYUKI

(54) HYALURONIDASE INHIBITOR OR ANTIMICROBIAL AGENT AND COSMETIC
CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject inhibitor or antimicrobial agent containing, as active ingredient, extract(s) from microalgae, kinds of those having not been reported so far, and to obtain cosmetics containing the above inhibitor or agent.

SOLUTION: This inhibitor or antimicrobial agent is an extract from microalgae selected from the genus Nostoc in the order Nostocales and the genus Spirulina in the order Oscillatoriales each belonging to the class Cyanophyceae, the genus Polyrhodium and Rhodella in the order Porphyridiales belonging to the class Rhodophyceae, the genus Chlorella in the order Chlorococcales and the genus Dunaliella in the order Volvocales each belonging to the class Chlorophyceae, and the genus Pleurochrysis in the order Isochrysidales belonging to the class Haptophyceae. the above inhibitor or agent is formulated as one of stocks in the other objective cosmetics.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Myxophyceae (Cyanophyceae) Nostoc eye (Nostocales) NOSUTOKKU group (Nostoc) And Oscillatoriales (Oscillatoriales) Spirulina (Spirulina), Rhodophyceae (Rhodophyceae) Porphyridiales (Porphyridiales) PORUFIRIDIUMU group (Porphyridium) And RODERA group (Rhodella) Chlorophyceae (Chlorophyceae) Chlorococcales (Chlorococcales) Chlorella (Chlorella) And Volvocales (Volvocales) DEYUNARIERA group (Dunaliella), Haptophyceae (Haptophyceae) Isochrysis eye (Isochrysidales) PURYUURO chestnut cis- group (Pleurochrysis) It is characterized by containing the extract of the detailed algae which belong as an active principle. A hyaluronidase inhibitor thru/or an antimicrobial agent.

[Claim 2] Claim 1 Cosmetics characterized by containing the hyaluronidase inhibitor thru/or antimicrobial agent of a publication.

[Claim 3] Claim 2 characterized by being chosen from a shampoo, a body shampoo, a rinse, soap, a lotion, face toilet, a milky lotion, and a cream Cosmetics of a publication.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the cosmetics containing the hyaluronidase inhibitor thru/or the antimicrobial agent, and this extract which contain the extract of detailed algae as an active principle.

[0002]

[Description of the Prior Art] Hyaluronidase is an enzyme which is widely distributed over the skin or mammalian tissue and participates in hydrolysis of hyaluronic acid. On the other hand, hyaluronic acid The skin, ligamentum nuchae, a main artery, a tendon, a bone, the cornea of an eye, a heart valve, Mucopolysaccharide which exists in a blood serum, a brain, and a certain kind of sarcomata, an edema, etc. 1 It is a seed. In an organization, become complex with protein and the viscous condition is presented. It has the important function referred to as that this complex removes bound water between cells, forms a jelly-like matrix, holds a cell, controls migration of the matter in a matrix, and presents the operation like lubricant at a joint, and prevents a bacterial invasion and osmosis of poison.

[0003] If the hyaluronic acid which exists in the skin by aging or the pathosis decreases in number, becoming the cause of desiccation, surface deterioration, silverfish, and a wrinkle is reported by when the moisture retainability of a cell declines. In addition, the thing which hyaluronidase is activated at the time of inflammation, and protein-hyaluronic acid complex tissue is destroyed, and is risen in the permeability of a blood vessel, I It is known [high] about possibility of participating in the process of the histamine isolation from the mast cell in mold allergy. Therefore, hyaluronidase inhibition activity not only participating in the hyaluronic acid level in a living body but anti-inflammation activity, It is thought that it participates also in antiallergic activity and anti-atopy activity, and hyaluronidase inhibitory action is accepted in the aspirin which is the chemical composition developed as a fact anti-inflammatory agent and an antiallergic agent, indomethacin, disodium cromoglycate, etc.

[0004] As a hyaluronidase inhibitor of current and the natural product origin, JU, a *Geranium thunbergii* Sieb. etZucc., the extract of a peony, Rose Fruit, cube gambir, areca, tea, and green tea reports -- having -- (publication number 2-11520 number official report) Moreover, *Monostroma* of Chlorophyceae, a sea lettuce group, a green laver group, the *Bryopsis* group, the *Caulerpa* group, A mill group, the hornwort group of brown algae, an OKINAWAMOZUKU group, the *Nemacystus* group, a KAJIME group, The genus *Lessonia*, a macro cis- TISU group, *Fucus*, *Ascophyllum*, A Derby rear group, *Porphyra* of red algae, a MAKUSA group, *Beckerella*, *Pterocladia*, a glue plant group, *Eucheuma speciosum*, the *Gigartina tenellus* group, and *Iridaea* The extract of the seaweed belonging to a group, a chondrus group, the *Palmaria* group, and the *Ceramium kondoi* group is reported. (publication number 9-67266 number official report) .

[0005] On the other hand, people's interest about public health is increasing in recent years, and researches and developments of the product which has antibacterial are done briskly. The antibacterial substance of the natural product origin also has especially few worries about a side effect, it is observed from the field of safety, many researches of the antibacterial substance of the vegetable origin are made, and the attempt which extracts an antibacterial substance from detailed algae is also performed briskly. As an antibacterial substance of the detailed algae origin, it is reported until now that the polysaccharide separated from the frond of PUREUROKURISHISU belonging to the *Isochrysis* eye of Haptophyceae has antimicrobial activity. (publication number 7-25780 number official report) .

[0006] Thus, in the field for which synthetic compounds were used conventionally, an increment of current of the inclination to ask a natural product for the active principle is enhanced, it is safe for the body and the matter which was excellent in effectiveness is called for.

[0007]

[Object of the Invention thru/or the purpose] However, like previous statement, it is reported conventionally, and the slack hyaluronidase activity inhibitor is restricted to the extract of crude drugs, tea, and some marine algae, and the antimicrobial agent was also restricted to the extract of some

seaweed. Therefore, the purpose of this invention is to offer the hyaluronidase inhibitor thru/or antimicrobial agent which makes an active principle the extract from the detailed algae of the class which is not reported conventionally. Other purposes of this invention are to offer the cosmetics containing such a hyaluronidase inhibitor thru/or an antimicrobial agent.

[0008]

[Means for Solving the Problem] The result of having examined various detailed algae wholeheartedly in order that this invention person etc. might solve the above-mentioned technical problem and might attain the desired end, Myxophyceae (Cyanophyceae) Nostoc eye (Nostocales) NOSUTOKKU group (Nostoc) And Oscillatoriales (Oscillatoriales) Spirulina (Spirulina) Rhodophyceae (Rhodophyceae) PORUFIRIDIUMU group of Porphyridiales (Porphyridiales) (Porphyridium) And RODERA group (Rhodella) Chlorophyceae (Chlorophyceae) Chlorococcales (Chlorococcales) Chlorella (Chlorella) and Volvocales (Volvocales) DEYUNARIERA group (Dunaliella) Haptophyceae (Haptophyceae) Isochrysis eye (Isochrysidales) PURYUURO chestnut cis- group (Pleurochrysis) It finds out that the extract of the detailed algae which belong has hyaluronidase inhibition activity thru/or antimicrobial activity. It came to complete this invention.

[0009] As the algae belonging to the NOSUTOKKU group of the Nostoc eye in Myxophyceae N.flagelliforme, N.commune, N.linckia, and N.muscorum It reaches. N.verrucosum It can illustrate. As the algae belonging to Spirulina of Oscillatoriales S.platensis, S.majar and S.maxima It reaches. S.subsalsa It can illustrate. As the algae belonging to the PORUFIRIDIUMU group of Porphyridiales in Rhodophyceae P.purpureum It reaches. P.cruentum It can illustrate. As the algae belonging to a RODERA group R.maculate It reaches. R.violacea It can illustrate. Chlorophyceae As the algae belonging to Chlorella of Chlorococcales which can be set C.pyrenoidosa, C. fusca, C.vulgaris, and C.saccharophila It reaches. C.ellipsoidea can be illustrated. As the algae belonging to the DEYUNARIERA group of Volvocales D.salina It reaches. D.tertiolecta It can illustrate. As the algae belonging to the PURYUURO chestnut cis- group of the Isochrysis eye in Haptophyceae P.carterae It reaches. P.haptonemafera It can illustrate. The extract of these algae has hyaluronidase inhibition activity.

[0010] inside of the above-mentioned algae S.platensis, S.majar, S.maxima, S.subsalsa, P.purpureum, P.cruentum, D.salina, D.tertiolecta, and P.carterae and -- P.haptonemafera The extract also has antimicrobial activity.

[0011] As cosmetics by this invention, a shampoo, a body shampoo, a rinse, soap, a lotion, face toilet, a milky lotion, and a cream can be illustrated.

[0012] The thing [that the detailed algae as a raw material use a natural thing, making it increase by culture from the field of adequate supply although it can also *****] is desirable. Since algae photosynthesize and are made into their energy, they can perform culture by the usual culture approach using the culture medium for algae culture to the bottom of an optical exposure. However, it will be as follows, if it is necessary to set up the optimal culture condition and a concrete culture condition is described about a typical thing among algae as stated above, since the culture approach changes a little with algae.

[0013] (1) N.flagelliforme if a culture culture medium is what is used in case freshwater cyanobacterium is cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- Modified Detmer medium It can use. However, N.flagelliforme Since it is a terrestrial and the culture using a liquid medium is difficult, it is an agar to the above-mentioned culture medium. 1.5 The culture medium of which weight % addition was done is used. Namely, ion exchange water As opposed to 1000ml KNO₃ 1g, MgSO₄·7H₂O 250mg, K₂HPO₄ 250mg and NaCl 100mg and -- CaCl₂·2H₂O 10mg the added solution -- preparing -- this solution FeSO₄·7H₂O 3.2 g/l Included metal ion solution 1ml H₃BO₃ 286 mg/l, MnSO₄·7H₂O 250 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 22.2 mg/l, and CuSO₄ and 5H₂O 7.9 mg/l It reaches. Na₂MoO₄·2H₂O 2.1mg/l. Trace element mixed solution to contain 1ml After adding pH 9.0 It adjusts and is an agar to this. 15 g/l What was added at a rate is used as a culture medium. It is a petri dish about this agar medium. (90mmφ×15mm) Abbreviation 10ml To the place in which it slushed and solidified N.flagelliforme It inoculates and cultivates. In addition, N.flagelliforme It compares with other algae,

and since the proliferation rate is slow, it is culture. 20-30 There is the need of carrying out continuously during a day. Culture is a ** term. 16 Time amount and dark term 8 It is an illuminance, considering as the cycle of time amount and using a fluorescent lamp as the light source. 100-150 microEinsteins/m²/sec It is desirable to set it as conditions. culture temperature 20 to 25 degree C it is -- 23 degrees C The neighborhood is desirable.

[0014] (2) *S.platensis* if a culture culture medium is what is used in case the common cyanobacterium from fresh water is cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- SOT medium It can use. 1000ml of namely, ion exchange water It receives. NaNO₃ 2.5g, K₂SO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 500mg, NaCl 1.0g, MgSO₄·7H₂O 200mg, CaCl₂·2H₂O 40mg, FeSO₄·7H₂O 10mg, and Na₂EDTA and 2H₂O 80mg And NaHCO₃ 16.8g The added solution is prepared. To this H₃BO₃ 286 mg/l, MnSO₄·7H₂O 250 mg/l, Trace element mixed solution containing ZnSO₄·7H₂O 22.2 mg/l, CuSO₄ and 5H₂O 7.9 mg/l, and Na₂MoO₄·2H₂O 2.1 mg/l 1ml What was added is used as a culture medium. Culture is *S.platensis*. The number of cells 5-7 x 10⁵ cells/ml The above-mentioned culture medium is inoculated so that it may become, and it is 2. It is carried out using the glass flat flask of liter capacity. Incubation period 7-10 Between days is suitable and culture is carbon dioxide gas. 5% It is an illuminance, using a fluorescent lamp as the light source under the aerobic condition which introduces the air mixed so that it might become concentration with a suitable aeration means. 100-150 microEinsteins/m²/sec It is desirable to set up and to carry out under a continuation light exposure. culture temperature 20 to 25 degree C it is -- 23 degrees C The neighborhood is desirable.

[0015] (3) *P.purpureum* if a culture culture medium is what is used in case common marine-products nature red algae are cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- Modified Koch medium It can use. Namely, fresh filtration seawater 1 As opposed to a liter KNO₃ 0.75g, KH₂PO₄ 25mg, MgSO₄·7H₂O 20mg, ammonium ferric citrate 2.5mg The culture medium was prepared by adding. To this culture medium, it is *P.purpureum*. The number of cells 10-20x10⁵ cells/ml It inoculates so that it may become, and it is 2. It cultivated with the glass flat flask of liter capacity. Incubation period 5-seven days are suitable and culture is carbon dioxide gas. 5% They are 10-30 microEinsteins/m²/sec about an illuminance, using a fluorescent lamp as the light source under the aerobic condition which introduces the air mixed so that it might become concentration with a suitable aeration means. It is desirable to set up and to carry out under a continuation light exposure. culture temperature 20 to 25 degree C it is -- 23 degrees C The neighborhood is desirable.

[0016] (4) *Rhodella* sp. if a culture culture medium is what is used in case common marine-products nature red algae are cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- Modified Koch medium It can use. Namely, fresh filtration seawater 1000ml It receives. KNO₃ 0.75g, K₂HPO₄ 25mg, MgSO₄·7H₂O 20mg, ammonium ferric citrate 2.5mg And nitril triacetic acid 10mg It can prepare by adding. Culture *Rhodella* sp. The number of cells 5-7x10⁵ cells/ml The above-mentioned culture medium is inoculated so that it may become, and it is 2. It cultivated with the glass flat flask of liter capacity. Incubation period 7-10 It is an illuminance, being under the aerobic condition into which between days is suitable for and culture introduces air with a suitable aeration means, and using a fluorescent lamp as the light source. Ten to 30 microEinsteins/m²/sec It is desirable to set up and to carry out to the bottom of a continuation light exposure. culture temperature 20 to 25 degree C it is -- 23 degrees C The neighborhood is desirable.

[0017] (5) *C.pyrenoidosa* if a culture culture medium is what is used in case common freshwater sexuparaous Chlorophyceae is cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- MC medium It can use. Namely, ion exchange water 1000ml It receives. KNO₃ 1.25g, MgSO₄·7H₂O 1.25g It reaches. K₂HPO₄ 1.25g The added solution is prepared. To this FeSO₄·7H₂O 320 mg/l Included metal ion solution 1ml H₃BO₃ 286 mg/l, MnSO₄·7H₂O 250mg/l, ZnSO₄·7H₂O 22.2 mg/l, CuSO₄ and 5H₂O 7.9 mg/l, and Na₂MoO₄·2H₂O 2.1 mg/l Trace element mixed solution to contain 1ml What was added is used as a culture medium. In addition, culture is ** as stated above. (2) According to the approach of a publication, it can carry out to a term.

[0018] (6) *D.salina* Although there will be no exceptional limit if a culture culture medium is used in case it cultivates common marine-products nature Chlorophyceae, salt concentration 2M It is made to

become. 1000ml of namely, fresh filtration seawater It receives. NaCl 116.88g, It reaches K₂HPO₄ 30mg KNO₃ 80mg and 4.7H₂O 0.6 mg MgSO. NaHCO₃ 420mg The added solution is prepared. To this CuSO₄ and 5H₂O 19.6 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 44 mg/l, CoCl₂·6H₂O 20 mg/l, MnCl₂·4H₂O 360 mg/l, and Na₂MoO₄·2H₂O 12.6mg/l. It reaches. Fe-EDTA 10 g/l Trace element mixed solution to contain 1ml A culture medium is prepared by adding. In addition, culture is ** as stated above. (2) According to the approach of a publication, it can carry out to a term.

[0019] (7) *P. carterae* if a culture culture medium is what is used in case common marine-products nature HAPUTO algae are cultivated -- an exceptional limit -- there is nothing -- for example, -- Eppley's medium It can use. Namely, fresh filtration seawater 1000ml It receives. KNO₃ 50.5mg It reaches. K₂HPO₄ 8.7mg In the added solution CuSO₄ and 5H₂O 19.6 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 44 mg/l, CoCl₂·6H₂O 20 mg/l, MnCl₂·4H₂O 360 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 12.6 mg/l and -- Fe-EDTA 10 g/l from -- becoming trace element mixed solution 1ml It adds. Subsequently, thiamine hydrochloride 200 mg/l, biotin 1 mg/l, cyanocobalamine 0.2 mg/l Vitamin mixed solution to contain 1ml The culture medium was prepared by adding. Culture *P. carterae* The number of cells 10-20x10⁵ cells/ml A culture medium is inoculated so that it may become, and it is 2. It carried out using the glass flat flask of liter capacity. incubation period 5-7 the bottom of the aerobic condition into which between days is suitable for and culture introduces air with a suitable aeration means -- and a fluorescent lamp -- the light source -- carrying out -- illuminance 40microEinsteins/m²/sec It is desirable to set up and to carry out to the bottom of a continuation light exposure. culture temperature 20 to 25 degree C it is -- 23 degrees C The neighborhood is desirable.

[0020] Thus, hyaluronidase inhibitor or an antibacterial substance is extracted from the obtained detailed algae by the following technique.

(a) Collect the cultivated fronds and frond concentration 1-70% Water is added so that it may become. room temperature -90 degree C Abbreviation 1-24 Time amount extent extract processing is carried out, subsequently it filters, and filtrate is made to freeze-dry. (sample 1) (b) Frond concentration 1-70% it becomes -- as -- 10-80% An ethanol water solution is added. Room temperature At -90 degree C 1-24 Carry out time amount extract processing, filter, and ethanol is removed from filtrate. Subsequently, it is made to freeze-dry. (sample 2) (c) Frond 100g 5 The water of the amount of double is added. 90 degrees C Abbreviation 3 Time amount churning is carried out. The last concentration to the supernatant obtained according to centrifugal separation 80% It is ETANO so that it may become. Fractionation of RU is added and carried out. subsequently, the ethanol of a supernatant is removed and it freeze-dries (sample 3) (d) The above (c) The sludge by the ethanol fractionation of a term is freeze-dried. (sample 4) (e) Frond 10g 10 The amount of double 80% An ethanol water solution is added. 90 degrees C Abbreviation It returns for 3 hours, and centrifugal separation is carried out, and ethanol is removed from the obtained supernatant and it freeze-dries. (sample 5) .

[0021] Although the extract of the detailed algae obtained as mentioned above shows hyaluronidase inhibition activity thru/or antimicrobial activity fundamentally, the residue after filtration or the sediment after centrifugal separation does not show such activity. (sample in the after-mentioned example of a trial refer to 4 terms) . This is presumed to be what is discovered by not only the thing resulting from high polymers, such as polysaccharide with large molecular weight, but amino acid, low-molecular sugar, a lipid which are the other low-molecular matter for hyaluronidase inhibition activity thru/or antimicrobial activity in this kind of detailed algae.

[0022]

[The example of manufacture] etc. Next, the example of manufacture and the example of a trial explain this invention still in detail and concretely.

[0023] example of manufacture 1 (a) Hot water extract : The following table [algae / various / detailed] 1 the desiccation powder obtained by performing a hot water extract on the shown conditions -- sample 1 ** -- it carried out.

[0024]

[Table 1]

微 細 藻 類	藻体量 (g)	添加水量	温 度 (℃)	時 間 (h)	乾燥重量 (g)
N. flagelliforme	1 0 0	3 3 倍量	9 0	3	6 . 2
S. platensis	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	1 3 . 2
P. purpureum	1 0 0	3 3 倍量	9 0	3	1 4 . 3
Rhodella sp.	1 0 0	1 2 . 5 倍量	9 0	3	5 . 8
C. pyrenoidosa	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	8 . 4
D. salina	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	7 . 3
P. carterae	1 0 0	5 倍量	9 0	3	1 9 . 4

[0025] (b) ethanol extract : The following table 2 Shown conditions 50% the desiccation powder obtained by performing extract processing using the ethanol water solution of concentration -- sample 2 ** -- it carried out.

[0026]

[Table 2]

微 細 藻 類	藻体量 (g)	エタノール 添加量	温 度 (℃)	時 間 (h)	乾燥重量 (g)
N. flagelliforme	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	5 . 0
S. platensis	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	1 2 . 0
P. purpureum	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	1 3 . 5
Rhodella sp.	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	2 0 . 5
C. pyrenoidosa	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	7 . 0
D. salina	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	9 . 3
P. carterae	1 0 0	1 0 倍量	9 0	3	1 8 . 5

[0027] (c) the supernatant which carried out hot water extract ethanol fractionation (supernatant) time amount churning, and was obtained according to centrifugal separation -- the last concentration [] -- adding and carrying out fractionation of the ethanol so that it may become 80%, removing the ethanol of a supernatant subsequently, and freeze-drying -- desiccation fine particles [] -- 5.9g was obtained. :

P. carterae 100g 5 the water of the amount of double -- adding -- 90 degrees C Abbreviation 3 It is a sample about this. 3 It carried out.

[0028] (d) Hot water extract ethanol fractionation (sludge) : On the other hand, the sludge by above-mentioned ethanol fractionation is freeze-dried, and they are desiccation fine particles. 13.3g It obtained. It is a sample about this. 4 It carried out.

[0029] (e) Ethanol reflux extract : *P. carterae* 10g 10 The amount of double 80% An ethanol water solution is added. 90 degrees C Abbreviation 3 They are desiccation fine particles by carrying out a time amount ring current, carrying out centrifugal separation, removing ethanol from the obtained supernatant and freeze-drying. 1.55g It obtained. It is a sample about this. 5 It carried out.

[0030] Example of a trial One The hyaluronidase of each extract is received in the hyaluronidase inhibition activity of the extract of the detailed algae origin obtained by the above-mentioned (hyaluronidase activity inhibition trial) approach. 50% Inhibition concentration (IC50) It carried out by asking. Namely, subject sample adjusted to predetermined concentration 1 Or subject sample 2 Hyaluronidase of the testis origin of a cow 0.1ml (type 4-S, the last enzyme activity 400 NF units/ml, sigma company make) It dissolved. 0.1M Acetic-acid buffer solution (pH 4.0) 0.2ml It adds and is 37 degrees C. It incubated for 20 minutes. Furthermore, activator 0.2ml (Compound 48/80 and Sigma what was dissolved in the above-mentioned acetic-acid buffer solution so that the last concentration of shrine make, CaCl₂, and NaCl might be set to 0.1mg/ml, 2.5mM, and 0.15M, respectively) It adds and is 37 degrees C. 20 It incubated between parts. Hyaluronic acid potassium of the crest origin of male domestic fowls in this (Wako Pure Chem, Inc. make) Solution 0.5ml It adds and is 37 degrees C. 40 0.4N NaOH 0.2ml after incubating between parts It added and the reaction was stopped. 10 after ice-cooling between parts, and the boric acid buffer solution (pH 9.1) 0.2ml adding -- 3 after boiling between parts - - again -- 10 a part -- between -- ice-cooling -- subsequently -- Para dimethylaminobenzaldehyde reagent 6ml adding -- 37 degrees C 20 It incubated between parts. Obtained reaction mixture 585nm The absorbance which can be set was measured. In addition, what added the acetic-acid buffer solution instead of the above-mentioned sample solution or an enzyme solution as a blank was used. Inhibition activity is shown by the rate of inhibition called for from a degree type.

[0031]

rate [of inhibition] : Absorbance of enzyme blank (%) [0032] = $[1 - (C-D)/(A-B)] \times 100$ A : Absorbance B of a subject sample blank : Absorbance C of the acetic-acid buffer solution : Absorbance D of the reaction solution of a subject sample and an enzyme From the rate of inhibition of the extract of each detailed algae 50% Inhibition concentration (IC50) The computed result is the following table. 3 It is as being shown. Myxophyceae *Nostoc* eye *N. flagelliforme* and *Oscillatoriales* *S. platensis*, Rhodophyceae *Porphyridiales* *P. purpureum* And *Rhodella*.sp., Chlorophyceae *Chlorococcales* *C. pyrenoidosa* And *Volvocales* *D. salina* and the Haptophyceae *Isochrysis* eye *P. carterae* Hyaluronidase inhibition activity was accepted in the extract. In addition, the result investigated similarly is also collectively shown about the disodium cromoglycate known as hyaluronidase inhibitor as reference.

[0033]

[Table 3]

微 細 藻 類	I C ₅₀ (mg/ml)	
	被験試料 1	被験試料 2
<u>N. flagelliforme</u>	4. 8 5	8. 6 5
<u>S. platensis</u>	0. 5 8	0. 3 9
<u>P. purpureum</u>	6. 3 1	6. 5 5
<u>Rhodella. sp.</u>	1. 2 2	5. 9 5
<u>C. pyrenoidosa</u>	1. 2 3	3. 2 6
<u>D. salina</u>	0. 7 0	1. 5 9
<u>P. carterae</u>	1. 4 2	8. 6 1
クロモグリク酸ナトリウム	0. 1 4	

[0034] Example of a trial Two Example of manufacture as stated above (antigenecity study) 1 Obtained HAPUTO alga (P.carterae) The antimicrobial activity trial was performed in the following way by making an extract into a subject sample. Namely, Staphylococcus aureus (Staphylococcusaureus) 37 degrees C It sets. 17-48 Nutrient agar medium after carrying out time amount culture 30ml It applied to the slushed petri dish. Subsequently, what infiltrated the subject sample into the paper disc is laid in the above-mentioned agar front face, and it is 37 degrees C. It sets. 12 Time amount culture is carried out and it is a minimum inhibitory concentration. (Media Interface Connector = mg/ml) It asked. The antimicrobial activity excellent in the following table was accepted by the result. 4 It is as being shown and is a hot water extract. (subject sample 1) Ethanol extract (subject sample 2) Supernatant of hot water extract ethanol fractionation (subject sample 3) And ethanol reflux extract (subject sample 5) Antimicrobial activity is accepted and it is the supernatant of hot water extract ethanol fractionation especially. (subject sample 3) However, sediment of hot water extract ethanol fractionation (subject sample 4) It became clear that antimicrobial activity was not shown.

[0035]

[Table 4]

最 小 阻 止 濃 度 (MIC = mg/ml)				
被験試料 1	被験試料 2	被験試料 3	被験試料 4	被験試料 5
2 5 0	1 0 0	1 3	—	1 0 0

[0036] Example of manufacture Two The following (body shampoo) table 5 Raw material shown (A), (B) It reaches. (C) Respectively 80 degrees C After heating and dissolving a solid Raw material (A) Raw material (B) It agitates adding gradually and, subsequently is a raw material. (C) It adds, after agitating,

it cools, and it is solution temperature. 30 degrees C The desired body shampoo was prepared by making.

[0037]

[Table 5]

	原 料	(重量%)
(A)	プロピレングリコール	11.0
	ラウリン酸	9.0
	ミリスチン酸	4.0
	ステアリン酸	3.0
	オリーブ油	0.5
(B)	水酸化カリウム	4.7
	精製水	36.5
(C)	椰子油脂脂肪酸ジエタノールアミド	5.0
	ラウリン酸アミドプロピルベタイン	25.0
	パラオキシ安息香酸メチル	0.2
	<u>S. platensis</u> の熱水抽出物	1.0

[0038] Example of manufacture Three The following (lotion) table 6 Many raw materials shown were mixed and the desired lotion was prepared with the conventional method.

[0039]

[Table 6]

原 料	(重量%)
グリセリン	5.0
カルボキシビニルポリマー (1% 溶液)	20.0
L-アルギニン	0.2
エタノール	5.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.2
<u>S. platensis</u> の熱水抽出物	0.5
精製水	69.1

[0040] example of manufacture Table of 4 following (cream) 7 Raw material shown (A) and -- (B) respectively -- 80 degrees C After heating and dissolving a solid Raw material (B) Raw material (A) It cools making it emulsify and agitating [add,] subsequently by agitating, and is the temperature of goods. 30 degrees C The desired cream was prepared by making.

[0041]

[Table 7]

	原 料	(重量%)
(A)	ステアリン酸	1. 0
	セタノール	4. 0
	スクワラン	10. 0
	オリーブ油	10. 0
	トリオクタン酸グリセリル	5. 0
	パラオキシ安息香酸プロピル	0. 1
	ソルビタンモノステアレート	2. 0
	ポリオキシエチレン(20 B. O)ソルビタン モノステアレート	1. 0
(B)	グリセリン	3. 0
	1,3-ブチレングリコール	4. 0
	パラオキシ安息香酸メチル	0. 2
	<u>S. platensis</u> の熱水抽出物	0. 5
	精製水	59. 2

[0042] Example of a trial Three The above-mentioned (use test) example of manufacture 2-4 He is a female volunteer about the body shampoo, lotion, and cream which were set and obtained. 6 Use evaluation by the name was performed. Namely, a body shampoo, a lotion, and a cream 1 It considers as a set. 3 What excepted from the component the Spirulina hot-water extract which I have use it every day [KA month-long], and is applied to this invention after that (contrast article) Even if it attaches, I have you use it, and it is related with this invention article and contrast article as stated above by the example of manufacture, and is the following table [gloss / surface deterioration prevention the flare of the skin, and / of the skin]. 8 It evaluated in accordance with the criteria shown.

[0043]

[Table 8]

評 価 基 準	点 数
製造例品の方が非常に良い	+ 3
かなり良い	+ 2
やや良い	+ 1
どちらも変わらない	0
対照品の方がやや良い	- 1
かなり良い	- 2
非常に良い	- 3

[0044] The result of a trial is the after-mentioned table. 9 It is shown. A numeric value is the sum total of the mark which the volunteer evaluated, and it is shown that this invention article is excellent, so that the sum total of mark is expensive. Consequently, it became clear that each sum total mark of the volunteer about this invention article show a high value, therefore this invention article improves the condition of the skin intentionally.

[0045]

[Table 9]

肌荒れ防止	肌の張り	肌の艶
+ 1 1	+ 9	+ 8

[0046]

[Effect of the Invention] By extracting ** by this invention from detailed algae, therefore using the cosmetics containing this **, since the safety to the body is high and hyaluronidase inhibition activity is high, hydrolysis of the hyaluronic acid in a living body is controlled, and the various effectiveness accompanying this, i.e., activation-izing of a skin cell, aging prevention of the skin, prevention of a wrinkle or surface deterioration, inflammation prevention, allergy prevention, and the atopy prevention effectiveness can be expected. In addition, although it is known in an allergic dermatitis patient's skin front face that Staphylococcus aureus is carrying out the plague, the cream which contains this ** since ** concerning this invention shows antimicrobial activity to Staphylococcus aureus is useful to these patients.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-228437

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月24日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/80	A D Z	A 6 1 K 35/80	A D Z Z
	A E D		A E D
7/00		7/00	K
			W
7/48		7/48	
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)			
(21) 出願番号	特願平10-30936	(71) 出願人	593206964 マイクロアルジェコーポレーション株式会社 東京都中央区銀座2丁目6番5号
(22) 出願日	平成10年(1998) 2月13日	(72) 発明者	藤谷 直貴 岐阜県岐阜市曙町4-15 MAC総合研究 所内
		(72) 発明者	榊 節子 岐阜県岐阜市曙町4-15 MAC総合研究 所内
		(74) 代理人	弁理士 佐々木 功 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤及び試剤を含有す

る化粧品

(57) 【要約】

【課題】 従来報告されていない種類の微細藻類からの抽出物を有効成分とするヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤を提供し、該剤を含有する化粧料を提供する。

【解決手段】 藍藻綱ネンジュモ目のノストック属又はユレモ目のスピリリナ属、紅藻綱チノリモ目のポルフィリディウム属又はロデラ属、緑藻綱クロコックム目のクロレラ属又はオオヒゲマワリ目のデュナリエラ属、ハプト藻綱イソクリシス目のブリュウロクリシス属から選択された微細藻類の抽出物を、化粧料の原料の一つとして添加する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 藍藻綱 (Cyanophyceae) ネンジュモ目 (Nostcales) のノストック属 (Nostoc) 及びユレモ目 (Oscillatoriales) のスピルリナ属 (Spirulina)、紅藻綱 (Rhodophyceae) チノリモ目 (Porphyridiales) のボルフィリディウム属 (Porphyridium) 及びロデラ属 (Rhodella)、緑藻綱 (Chlorophyceae) クロコッカム目 (Chlorococcales) のクロレラ属 (Chlorella) 及びオオヒゲマワリ目 (Volvocales) のデュナリエラ属 (Dunaliella)、ハプト藻綱 (Haptophyceae) イソクリシス目 (Isochrysidales) プリュウロクリシス属 (Pleurochrysis) に属する微細藻類の抽出物を有効成分として含有していることを特徴とする、ヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤。

【請求項2】 請求項1に記載のヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤を含有していることを特徴とする、化粧品。

【請求項3】 シャンプー、ボディシャンプー、リンス、石鹸、ローション、化粧水、乳液及びクリームから選択されたものであることを特徴とする、請求項2に記載の化粧品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は微細藻類の抽出物を有効成分として含有するヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤及び該抽出物を含有する化粧料に係る。

【0002】

【従来の技術】 ヒアルロニダーゼは皮膚や哺乳動物組織に広く分布しており、ヒアルロン酸の加水分解に関与する酵素である。一方、ヒアルロン酸は皮膚、項部、大動脈、腱、骨、目の角膜、心臓弁、血清、脳、ある種の肉腫及び水腫等に存在するムコ多糖類の1種であり、組織においては蛋白質との複合体となって粘潤な状態を呈しており、この複合体は細胞間で結合水を除去し、ゼリー状のマトリクスを形成して細胞を保持し、細胞間質における物質の移動を抑制し、関節では潤滑的な作用を呈し、又細菌の侵入や毒物の浸透を防止すると云う重要な機能を有している。

【0003】 老化又は病的状態により皮膚に存在するヒアルロン酸が減少すると、細胞の保湿力が低下することにより乾燥、肌荒れ、シミ、皺の原因となることが報告されている。尚、ヒアルロニダーゼは炎症時に活性化され、蛋白質-ヒアルロン酸複合組織を破壊し、血管の透過性を亢進すること、I型アレルギーにおける肥満細胞からのヒスタミン遊離の過程に関与している可能性の高いことが知られており、従ってヒアルロニダーゼ阻害活性は生体中のヒアルロン酸レベルに関与するのみならず抗炎症活性、抗アレルギー活性及び抗アトピー活性にも関与するものと考えられ、事実抗炎症剤及び抗アレルギー剤として開発された化学合成品であるアスピリン、イ

ンドメタシン、クロモグリク酸ナトリウム等にヒアルロニダーゼ阻害作用が認められている。

【0004】 現在、天然物由来のヒアルロニダーゼ阻害剤としてはジュ、ゲンノショウコ、シャクヤク、エイジツ、アセンヤク、ビンロウジ、紅茶及び緑茶の抽出物が報告され (特開平2-11520号公報)、又緑藻類のヒトエグサ属、アオサ属、アオノリ属、ハネモ属、イワヅタ属、ミル属、褐藻類のマツモ属、オキナワモズク属、モズク属、カジメ属、レソニア属、マクロシステス属、ヒバマタ属、アスコフィラム属、ダービリア属、紅藻類のアマノリ属、マクサ属、ヒラクサ属、オバクサ属、フノリ属、キリンサイ属、スギノリ属、Iridaea属、ツノマタ属、ダルス属、イギス属に属する海藻の抽出物が報告されている (特開平9-67266号公報)。

【0005】 一方、近年公衆衛生に対する人々の関心が高まっており、抗菌性を有する製品の研究開発が盛んに行われている。殊に、天然物由来の抗菌性物質は副作用の心配も少なく、安全性の面から注目され、植物由来の抗菌性物質の研究が多くなされており、微細藻類から抗菌性物質を抽出する試みも盛んに行われている。これまで微細藻類由来の抗菌性物質としては、ハプト藻綱のイソクリシス目に属するプレウロクリシスの藻体から分離された多糖類は抗菌活性を有することが報告されている (特開平7-25780号公報)。

【0006】 このように従来合成品が使用されていた分野において、その有効成分を天然物に求める傾向は現在も増加の一途を辿り、人体に安全で且つ効果の優れた物質が求められている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題乃至目的】 しかしながら、既述のように、従来報告されてきたヒアルロニダーゼ活性阻害剤は生薬類や茶類及び一部の海藻類の抽出物に限られており、又抗菌剤も又一部の海藻類の抽出物に限られていた。従って、本発明の目的は従来報告されていない種類の微細藻類からの抽出物を有効成分とするヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤を提供することにある。本発明の他の目的は、このようなヒアルロニダーゼ阻害剤乃至抗菌剤を含有する化粧料を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の課題を解決し、所期の目的を達成するために種々の微細藻類について鋭意検討を行った結果、藍藻綱 (Cyanophyceae) ネンジュモ目 (Nostcales) のノストック属 (Nostoc) 及びユレモ目 (Oscillatoriales) のスピルリナ属 (Spirulina)、紅藻綱 (Rhodophyceae) チノリモ目 (Porphyridiales) のボルフィリディウム属 (Porphyridium) 及びロデラ属 (Rhodella)、緑藻綱 (Chlorophyceae) クロコッカム目 (Chlorococcales) のクロレラ属 (Chlorella) 及びオオヒゲマワリ目 (Volvocales) のデュナリエラ属

(Dunaliella)、ハプト藻綱 (Haptophyceae) イソクリシス目 (Isochrysidales) のアリュウロクリシス属 (Pleurochrysis) に属する微細藻類の抽出物がヒアルロニダーゼ阻害活性乃至抗菌活性を有していることを見出して本発明を完成するに至った。

【0009】藍藻綱におけるネンジュモ目のノストック属に属する藻類としては *N. flagelliforme*、*N. commune*、*N. linckia*、*N. muscorum* 及び *N. verrucosum* を例示することができ、ユレモ目のスピルリナ属に属する藻類としては *S. platensis*、*S. major*、*S. maxima* 及び *S. subsalsa* を例示することができ、紅藻綱におけるチノリモ目のボルフィリディウム属に属する藻類としては *P. purpureum* 及び *P. cruentum* を例示することができ、ロデラ属に属する藻類としては *R. maculate* 及び *R. violacea* を例示することができ、緑藻綱におけるクロロコクム目のクロレラ属に属する藻類としては *C. pyrenoidosa*、*C. fusca*、*C. vulgaris*、*C. saccharophila* 及び *C. ellipsoidea* を例示することができ、オオヒゲマワリ目のデュナリエラ属に属する藻類としては *D. salina* 及び *D. tertiolecta* を例示することができ、ハプト藻綱におけるイソクリシス目のアリュウロクリシス属に属する藻類としては *P. carterae* 及び *P. haptonemafera* を例示することができる。これら藻類の抽出物はヒアルロニダーゼ阻害活性を有している。

【0010】上記の藻類の内では *S. platensis*、*S. major*、*S. maxima*、*S. subsalsa*、*P. purpureum*、*P. cruentum*、*D. salina*、*D. tertiolecta*、*P. carterae* 及び *P. haptonemafera* の抽出物は抗菌活性を有している。

【0011】本発明による化粧料としてはシャンプー、ボディシャンプー、リンス、石鹸、ローション、化粧水、乳液及びクリームを例示することができる。

【0012】原料としての微細藻類は天然のものをその低利用することもできるが、安定供給の面から培養により増殖させて使用することが望ましい。藻類は光合成を行って自らのエネルギーとしているため、培養は光照射の下に藻類培養用の培地を用い、通常の培養方法により行うことができる。但し、藻類によって培養方法が若干異なるために最適な培養条件を設定する必要があり、既述の藻類の内では代表的なものについて具体的な培養条件を述べれば下記の通りである。

【0013】(1) *N. flagelliforme* の培養
培地は淡水性藍藻類を培養する際に用いられているものであれば格別な制限はなく、例えば Modified Detmer medium を用いることができる。但し、*N. flagelliforme* は陸生であり、液体培地を用いた培養は困難であるために、上記培地に寒天を 1.5 重量% 添加した培地を用いる。即ち、イオン交換水 1000ml に対して、 KNO_3 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg、 K_2HPO_4 250mg、 NaCl 100mg 及び $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mg を添加した溶液を調製し、この溶液に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.2g/l を含む金属イオン溶液 1ml と、 H_3BO_3

286mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/l 及び $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/l を含有する微量元素混合溶液 1ml を添加した後に、pH を 9.0 に調整し、これに寒天を 15g/l の割合で添加したものが培地として使用される。この寒天培地をシャーレ (90mmφ×15mm) に約 10ml 流し込み、固まったところに *N. flagelliforme* を接種して培養する。尚、*N. flagelliforme* は他の藻類と比較して増殖速度が遅いため、培養は 20 - 30 日間継続して行う必要がある。培養は明期 16 時間及び暗期 8 時間のサイクルとし、蛍光灯を光源として照度を 100 - 150 $\mu\text{Einsteins}/\text{m}^2/\text{sec}$ の条件に設定するのが好ましい。培養温度は 20 - 25℃ であり、23℃ 付近が望ましい。

【0014】(2) *S. platensis* の培養

培地は一般的な淡水産藍藻類を培養する際に用いられるものであれば格別な制限はなく、例えば SOT medium を用いることができる。即ち、イオン交換水 1000ml に対して、 NaNO_3 2.5g、 K_2SO_4 1.0g、 K_2HPO_4 500mg、 NaCl 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80mg 及び NaHCO_3 16.8g を添加した溶液を調製し、これに H_3BO_3 286mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/l を含有する微量元素混合溶液を 1ml 添加したものが培地として使用される。培養は、*S. platensis* の細胞数が 5 - 7 × 10⁵ cells/ml となるように上記の培地に接種し、2 リットル容のガラス製扁平フラスコを用いて行われる。培養期間は 7 - 10 日間が適当であり、培養は炭酸ガスを 5% 濃度となるように混合した空気を適当な通気手段により導入する好気的条件下において且つ蛍光灯を光源として照度を 100 - 150 $\mu\text{Einsteins}/\text{m}^2/\text{sec}$ に設定し、連続光照射下で行うのが好ましい。培養温度は 20 - 25℃ であり、23℃ 付近が望ましい。

【0015】(3) *P. purpureum* の培養

培地は一般的な海産性紅藻類を培養する際に用いられているものであれば格別な制限はなく、例えば Modified Koch medium を用いることができる。即ち、新鮮な伊過海水 1 リットルに対して KNO_3 0.75g、 KH_2PO_4 25mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg、クエン酸アンモニウム鉄 2.5mg を添加することにより培地を調製した。この培地に、*P. purpureum* の細胞数が 10 - 20 × 10⁵ cells/ml となるように接種し、2 リットル容のガラス製扁平フラスコにて培養した。培養期間は 5 - 7 日間が適当であり、培養は炭酸ガスを 5% 濃度となるように混合した空気を適当な通気手段により導入する好気的条件下において且つ蛍光灯を光源として照度を 10 - 30 $\mu\text{Einsteins}/\text{m}^2/\text{sec}$ に設定し、連続光照射下で行うのが好ましい。培養温度は 20 - 25℃ であり、23℃ 付近が望ましい。

【0016】(4) *Rhodella* sp. の培養

培地は一般的な海産性紅藻類を培養する際に用いられて

いるものであれば格別な制限はなく、例えば Modified Koch medium を用いることができる。即ち、新鮮な濾過海水 1000ml に対して KNO_3 0.75g、 K_2HPO_4 25mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg、クエン酸アンモニウム鉄 2.5mg 及びニトリル三酢酸 10mg を添加することにより調製することができる。培養は *Rhodella* sp. の細胞数が $5-7 \times 10^5$ cells/ml となるように上記の培地に接種し、2 リットル容のガラス製扁平フラスコにて培養した。培養期間は 7 - 10 日間が適当であり、培養は空気を適当な通気手段により導入する好気的条件下で且つ蛍光灯を光源として照度を $10-30 \mu \text{Einstein/m}^2/\text{sec}$ に設定し、連続光照射下において行うのが好ましい。培養温度は $20-25^\circ\text{C}$ であり、 23°C 付近が望ましい。

【0017】(5) *C. pyrenoidosa* の培養

培地は一般的な淡水産性緑藻類を培養する際に用いられているものであれば格別な制限はなく、例えば MC medium を用いることができる。即ち、イオン交換水 1000ml に対して KNO_3 1.25g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25g 及び K_2HPO_4 1.25g を添加した溶液を調製し、これに $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 320mg/l を含む金属イオン溶液 1ml と H_3BO_3 286mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.2mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1mg/l とを含有する微量元素混合溶液 1ml を添加したものを培地として用いる。尚、培養は既述の第(2)項に記載の方法に準じて行うことができる。

【0018】(6) *D. salina* の培養

培地は一般的な海産性緑藻類を培養する際に用いられているものであれば格別な制限はないが、塩濃度が 2M となるようにする。即ち、新鮮な濾過海水 1000ml に対して NaCl 116.88g、 KNO_3 80mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6mg、 K_2HPO_4 30mg 及び NaHCO_3 420mg を添加した溶液を調製し、これに $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.6mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44mg/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mg/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 360mg/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.6mg/l 及び Fe-EDTA 10g/l を含有する微量元素混合溶液 1ml を添加することにより培地を調製する。尚、培養は既述の第(2)項に記載の方法に準じて行うことができる。

【0019】(7) *P. carterae* の培養

培地は一般的な海産性バクト藻類を培養する際に用いられているものであれば格別な制限はなく、例えば Eppley's medium を用いることができる。即ち、新鮮な濾過海水 1000ml に対して KNO_3 50.5mg 及び K_2HPO_4 8.7mg を添加した溶液に、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.6mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44mg/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mg/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 360mg/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12.6mg/l 及び Fe-EDTA 10g/l からなる微量元素混合溶液 1ml を添加し、次いでチアミン塩酸塩 200mg/l、ビオチン 1mg/l、シアノコバラミン 0.2mg/l

を含有するビタミン混合溶液 1ml を添加することにより培地を調製した。培養は *P. carterae* の細胞数が $10-20 \times 10^5$ cells/ml となるように培地に接種し、2 リットル容のガラス製扁平フラスコを用いて行った。培養期間は 5 - 7 日間が適当であり、培養は空気を適当な通気手段により導入する好気的条件下に且つ蛍光灯を光源として照度を $40 \mu \text{Einstein/m}^2/\text{sec}$ に設定し、連続光照射下において行うのが好ましい。培養温度は $20-25^\circ\text{C}$ であり、 23°C 付近が望ましい。

【0020】このようにして得られた微細藻類からヒアルロニダーゼ阻害物質或いは抗菌性物質は下記の手法により抽出される。

(a) 培養した藻体を収集し、藻体濃度が 1 - 70% となるように水を添加し、室温 - 90°C で約 1 - 24 時間程度抽出処理し、次いで濾過して濾液を凍結乾燥させる(試料 1)、(b) 藻体濃度が 1 - 70% となるように 10 - 80% のエタノール水溶液を添加し、室温 - 90°C で 1 - 24 時間抽出処理し、濾過し、濾液からエタノールを除去し、次いで凍結乾燥させる(試料 2)、(c) 藻体 100g に 5 倍量の水を添加して 90°C で約 3 時間攪拌し、遠心分離により得られた上澄みに最終濃度が 80% となるようにエタノールを添加して分画し、次いで上澄みのエタノールを除去して凍結乾燥する(試料 3)、(d) 上記(c)項のエタノール分画による析出物を凍結乾燥する(試料 4)、(e) 藻体 10g に 10 倍量の 80% エタノール水溶液を添加して 90°C で約 3 時間環流し、遠心分離し、得られた上澄みからエタノールを除去して凍結乾燥する(試料 5)。

【0021】上記のようにして得られた微細藻類の抽出物は、基本的には、ヒアルロニダーゼ阻害活性乃至抗菌活性を示すが、濾過後の残渣又は遠心分離後の沈査はこれらの活性を示さない(後記の試験例における試料 4 の項参照)。このことは、この種の微細藻類においてヒアルロニダーゼ阻害活性乃至抗菌活性は分子量の大きい多糖類等の高分子物質に起因するものだけでなく、それ以外の低分子物質であるアミノ酸や低分子糖及び脂質等により発現されるものと推定される。

【0022】

【製造例等】次に、製造例、試験例により本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

【0023】製造例 1

(a) 熱水抽出：各種微細藻類について、下記の表 1 に示す条件にて熱水抽出を行い、得られた乾燥粉末を試料 1 とした。

【0024】

【表 1】

10

20

30

40

微細藻類	藻体量 (g)	添加水量	温度 (℃)	時間 (h)	乾燥重量 (g)
<i>N. flagelliforme</i>	100	33倍量	90	3	6.2
<i>S. platensis</i>	100	10倍量	90	3	13.2
<i>P. purpureum</i>	100	33倍量	90	3	14.3
<i>Rhodella</i> sp.	100	12.5倍量	90	3	5.8
<i>C. pyrenoidosa</i>	100	10倍量	90	3	8.4
<i>D. salina</i>	100	10倍量	90	3	7.3
<i>P. carterae</i>	100	5倍量	90	3	19.4

【0025】(b) エタノール抽出：下記の表2に示す * 【0026】

条件にて50%濃度のエタノール水溶液を用いて抽出 20 【表2】

理を行ない、得られた乾燥粉末を試料2とした。 *

微細藻類	藻体量 (g)	エタノール 添加量	温度 (℃)	時間 (h)	乾燥重量 (g)
<i>N. flagelliforme</i>	100	10倍量	90	3	5.0
<i>S. platensis</i>	100	10倍量	90	3	12.0
<i>P. purpureum</i>	100	10倍量	90	3	13.5
<i>Rhodella</i> sp.	100	10倍量	90	3	20.5
<i>C. pyrenoidosa</i>	100	10倍量	90	3	7.0
<i>D. salina</i>	100	10倍量	90	3	9.3
<i>P. carterae</i>	100	10倍量	90	3	18.5

【0027】(c) 熱水抽出エタノール分画(上澄み)： 40※0gに10倍量の80%エタノール水溶液を添加して90℃で約3時間攪拌し、遠心分離により得られた上澄みに最終濃度が80%となるようにエタノールを添加して分画し、次いで上澄みのエタノールを除去して凍結乾燥することにより、乾燥粉末5.9gを得た。これを試料3とした。

【0028】(d) 熱水抽出エタノール分画(析出物)： 一方、上述のエタノール分画による析出物を凍結乾燥し、乾燥粉末13.3gを得た。これを試料4とした。

【0029】(e) エタノール還流抽出： *P. carterae* 1※50

℃で約3時間環流し、遠心分離し、得られた上澄みからエタノールを除去して凍結乾燥することにより、乾燥粉末1.55gを得た。これを試料5とした。

【0030】試験例1(ヒアルロニダーゼ活性阻害試験)

上記方法にて得られた微細藻類由来の抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性を、各抽出物のヒアルロニダーゼに対する50%阻害濃度(IC₅₀)を求めることにより行った。即ち、所定濃度に調整した被験試料1又は被験試料2に、牛の鞣丸由来のヒアルロニダーゼ0.1ml(typ

e 4-S、最終酵素活性 400NF units/ml、シグマ社製)を溶解した 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 0.2ml を添加し、37℃ で 20 分間インキュベートした。更に、活性化剤 0.2ml (Compound 48/80、Sigma 社製、CaCl₂、NaCl の最終濃度がそれぞれ 0.1mg/ml、2.5mM、0.15M となるように上記の酢酸緩衝液に溶解したもの) を添加し、37℃ で 20 分間インキュベートした。これに雄性家禽の鶏冠由来のヒアルロン酸カリウム (和光純薬株式会社製) 溶液 0.5ml を添加し、37℃ で 40 分間インキュベートした後、0.4N NaOH 0.2ml を添加して反応を停止させた。10 分間水冷後、硼酸緩衝液 (pH 9.1) 0.2ml を添加し、3 分間煮沸した後、再び 10 分間水冷し、次いで p-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬 6ml を添加し、37℃ で 20 分間インキュベートした。得られた反応液について 585nm における吸光度を測定した。尚、ブランクとして上記の試料溶液や酵素溶液の代わりに酢酸緩衝液を添加したものをを用いた。阻害活性は次式から求められる阻害率で示される。

【0031】

*

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (C - D) / (A - B)] \times 100$$

A : 被験試料ブランクの吸光度

B : 酢酸緩衝液の吸光度

C : 被験試料と酵素の反応溶液の吸光度

D : 酵素 blank の吸光度

【0032】各微細藻類の抽出物の阻害率から 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した結果は下記の表 3 に示されている通りであり、藍藻綱ネンジュモ目の *N. flagelliforme* 及びユレモ目の *S. platensis*、紅藻綱チノリモ目の *P. purpureum* 及び *Rhodella. sp.*、緑藻綱クロコックム目の *C. pyrenoidosa* 及びオオヒゲマワリ目の *D. salina*、ハプト藻綱イソクリシス目の *P. carterae* の抽出物にヒアルロニダーゼ阻害活性が認められた。尚、参考としてヒアルロニダーゼ阻害物質として知られているクロモグリク酸ナトリウムについて同様に調べた結果も併せて示されている。

【0033】

【表3】

微 細 藻 類	I C ₅₀ (mg/ml)	
	被験試料 1	被験試料 2
<i>N. flagelliforme</i>	4. 8 5	8. 6 5
<i>S. platensis</i>	0. 5 8	0. 3 9
<i>P. purpureum</i>	6. 3 1	6. 5 5
<i>Rhodella. sp.</i>	1. 2 2	5. 9 5
<i>C. pyrenoidosa</i>	1. 2 3	3. 2 6
<i>D. salina</i>	0. 7 0	1. 5 9
<i>P. carterae</i>	1. 4 2	8. 6 1
クロモグリク酸ナトリウム	0. 1 4	

【0034】試験例 2 (抗菌性試験)

既述の製造例 1 により得たハプト藻 (*P. carterae*) 抽出物を被験試料として抗菌活性試験を下記の要領で行った。即ち、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を 37℃ において 17 - 48 時間培養した後、普通寒天培地 30ml を流し込んだシャーレに塗布した。次いで、ペーパディスクに被験試料をしみ込ませたものを上記の寒天表面に載置し、37℃ において 12 時間培養して最小阻止濃度 (MIC = mg/ml) を求めた。結果は下記の表 4 に示されている通りであり、熱水抽出物 (被験試料 ※50

※1)、エタノール抽出物 (被験試料 2)、熱水抽出エタノール分画の上澄み (被験試料 3) 及びエタノール還流抽出物 (被験試料 5) に抗菌活性が認められ、殊に熱水抽出エタノール分画の上澄み (被験試料 3) に優れた抗菌活性が認められた。しかしながら、熱水抽出エタノール分画の沈査 (被験試料 4) は抗菌活性を示さないことが判明した。

【0035】

【表4】

11

12

最小阻止濃度 (MIC = $\mu\text{g/ml}$)				
被験試料 1	被験試料 2	被験試料 3	被験試料 4	被験試料 5
250	100	13	—	100

【0036】製造例 2 (ボディシャンプー)

* になすことにより所望のボディシャンプーを調製し

下記の表 5 に示される原料 (A)、(B) 及び (C) をそれ

た。

それぞれ 80℃ で加熱して固形物を溶解させた後に、原料 10 【0037】

(A) に 原料 (B) を徐々に添加しながら攪拌し、次いで 【表5】

原料 (C) を添加して攪拌した後、冷却して液温を 30℃ *

	原 料	(重量%)
(A)	プロピレングリコール	11.0
	ラウリン酸	9.0
	ミリスチン酸	4.0
	ステアリン酸	3.0
	オリーブ油	0.5
(B)	水酸化カリウム	4.7
	精製水	36.5
(C)	椰子油脂脂肪酸ジエタノールアミド	5.0
	ラウリン酸アミドプロピルベタイン	25.0
	パラオキシ安息香酸メチル	0.2
	<i>S. platensis</i> の熱水抽出物	1.0

【0038】製造例 3 (ローション)

30※【0039】

下記の表 6 に示される諸原料を混合して、常法により 【表6】

所望のローションを調製した。

※

原 料	(重量%)
グリセリン	5.0
カルボキシビニルポリマー (1% 溶液)	20.0
L-アルギニン	0.2
エタノール	5.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.2
<i>S. platensis</i> の熱水抽出物	0.5
精製水	69.1

【0040】製造例 4 (クリーム)

★いで攪拌しつつ冷却して品温を 30℃ になすことによ

下記の表 7 に示される原料 (A) 及び (B) をそれぞれ り、所望のクリームを調製した。

80℃ に加熱して固形物を溶解させた後に、原料 (B) を 【0041】

原料 (A) に添加して攪拌することにより乳化させ、次★ 【表7】

	原 料	(重量%)
(A)	ステアリン酸	1.0
	セタノール	4.0
	スクワラン	10.0
	オリーブ油	10.0
	トリオクタン酸グリセリル	5.0
	パラオキシ安息香酸プロピル	0.1
	ソルビタンモノステアレート	2.0
	ポリオキシエチレン(20 E.O)ソルビタン モノステアレート	1.0
(B)	グリセリン	3.0
	1,3-ブチレングリコール	4.0
	パラオキシ安息香酸メチル	0.2
	<i>S. platensis</i> の熱水抽出物	0.5
	精製水	59.2

【0042】試験例3(使用テスト)

上記の製造例2-4において得られたボディシャンブー、ローション及びクリームについて、女性ボランティア6名による使用評価を行った。即ち、ボディシャンブー、ローション及びクリームを1セットとして3ヶ月間毎日使用してもらい、その後、本発明に係るスビル*

20*リナ熱水抽出物を成分から除外したもの(対照品)についても使用してもらい、既述の製造例による本発明品と対照品とに関し肌荒れ防止、肌の張り、肌の艶について下記の表8に示される基準に従って評価した。

【0043】

【表8】

評 価 基 準	点 数
製造例品の方が非常に良い	+3
かなり良い	+2
やや良い	+1
どちらも変わらない	0
対照品の方がやや良い	-1
かなり良い	-2
非常に良い	-3

【0044】試験の結果は後記の表9に示されている。数値はボランティアの評価した点数の合計であり、点数の合計が高いほど本発明品が優れていることを示している。その結果、本発明品に関するボランティアの合※40

※計点数は何れも高い値を示し、従って本発明品は肌の状態を有意に改善することが明らかとなった。

【0045】

【表9】

肌荒れ防止	肌の張り	肌の艶
+11	+9	+8

【0046】

【発明の効果】本発明による剤は微細藻類から抽出されたものであり、従って人体に対する安全性が高く且つヒアルロニダーゼ阻害活性が高いので、この剤を含有する化粧料を使用することにより、生体中のヒアルロン酸の★50

★加水分解が抑制され、これに伴う種々の効果、即ち皮膚細胞の賦活化、皮膚の老化防止、皺や肌荒れの防止、炎症防止、アレルギー防止、アトピー防止効果を期待することができる。尚、アレルギー性皮膚炎患者の皮膚表面には黄色ブドウ球菌が異常増殖していることが知られて

いるが、本発明に係る剤は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すので該剤を含有するクリーム等は、これらの

患者に対して有用である。

フロントページの続き

(72)発明者 山田 麻代
岐阜県岐阜市曙町4-15 MAC総合研究
所内

(72)発明者 山口 祐司
岐阜県岐阜市曙町4-15 MAC総合研究
所内

(72)発明者 竹中 裕行
岐阜県岐阜市曙町4-15 MAC総合研究
所内